

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

DEVICE FOR INTRODUCING HIGH POLYMER TO CELL

Patent Number: JP62265975
Publication date: 1987-11-18
Inventor(s): MOCHIZUKI TAKANORI
Applicant(s): SHIMADZU CORP
Requested Patent: ☐ JP62265975
Application Number: JP19860109178 19860512
Priority Number(s):
IPC Classification: C12M1/00; C12N15/00
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To raise probability of introduction of high polymer to cell, by electrically stimulating a cell suspension in a heated state, cooling the suspension, lessening damage of the cell and extended keeping disturbance of cell membrane after electric stimulation.

CONSTITUTION: A heat part 2 also used as a chamber is connected through a thin connecting part 6 to a cooling part 4 and given electric voltage is impressed between a pair of electrodes 22 and 24 by a DC electric source device 26. A high polymer such as gene, etc., and a cell are suspended in a cell suspension 16, the cell suspension is fed to the heating part 2 and a piston 12 is dropped by a driving gear 14 at a constant speed. The cell is electrically stimulated when the cell suspension 16 passes through the connecting part 6.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-265975

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)11月18日

C 12 M 1/00
C 12 N 15/00
// C 12 N 13/00
G 01 N 33/48

8114-4B
7115-4B
7133-4B
M-8305-2G 審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 細胞への高分子導入装置

⑯ 特 願 昭61-109178

⑰ 出 願 昭61(1986)5月12日

⑱ 発 明 者 望 月 崇 孝 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

⑲ 出 願 人 株式会社島津製作所 京都市中京区西ノ京桑原町1番地

⑳ 代 理 人 弁理士 野口 繁雄

明 細 書

1. 発明の名称

細胞への高分子導入装置

2. 特許請求の範囲

(1) 細胞懸濁液を加熱する加熱部と、細胞懸濁液を冷却する冷却部とを一体的に設け、細胞懸濁液を前記加熱部から冷却部へ移動させる移動手段を備え、かつ、前記加熱部により加熱された細胞懸濁液に電気刺激を加える一対の電極を備えた細胞への高分子導入装置。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は遺伝子などの高分子を電気刺激などを用いて細胞内に取り込ませるための装置に関するものである。

(従来の技術)

細胞内に遺伝子などの高分子を電気刺激などを利用して取り込ませることは古くから知られ、この方法を用いて遺伝子を細胞内に導入することが行なわれている。これは、細胞に電気刺激を加え

ると細胞膜の脂質二重層が一次的に乱され、細胞の極が発生する事実に基づいている。この細胞の極は電気刺激が加えられた方向と同一の頂点において特に顕著に発生する。細胞の極が発生することを一般に「細胞に孔が開く」と称され、この孔を通して細胞の外にある遺伝子が細胞内に取り込まれる。

従来の高分子導入装置では、チャンバ内に一対の対向する電極を設け、細胞とその細胞へ導入しようとする遺伝子などの高分子を懸濁した細胞懸濁液をその一対の電極間に収容し、電極に電圧を印加することにより細胞に電気刺激を与えるようになっている。

(発明が解決しようとする問題点)

細胞膜に一次的に乱れを作るために加えられる電気刺激は、適切に加えないと細胞の破壊につながる。また、電気刺激を適切に加えた場合においても、細胞膜の乱れは数秒程度で消滅し、元の状態に戻ってしまう。遺伝子などの高分子が細胞内へ取り込まれるのは細胞膜が一次的に乱されてい

る期間に傾られるので、遺伝子などの高分子が細胞内へ取り込まれる確率は低く、そのため細胞内での遺伝子の発現率が低いという問題がある。

本発明は、細胞に加える電気刺激を極力抑えて細胞に与える損傷を小さくするとともに、電気刺激が加わった後の乱れを長く保つことにより遺伝子などの高分子が細胞へ導入される確率を高めることのできる装置を提供することを目的とするものである。

(問題点を解決するための手段)

本発明の高分子導入装置では、細胞懸濁液を加熱する加熱部と、細胞懸濁液を冷却する冷却部とが一体的に設けられ、細胞懸濁液を前記加熱部から冷却部へ移動させる移動手段を備え、かつ、前記加熱部により加熱された細胞懸濁液に電気刺激を加える一対の電極を備えている。

(作用)

細胞に電気刺激を加えるときは、細胞懸濁液は加熱部により加熱された状態となっている。温度が上ると細胞膜の流動性が増すので、細胞に過度

の電気刺激を与えなくても細胞膜に乱れを発生させることができる。電気刺激を与えた後は細胞懸濁液を冷却する。温度を下げることにより細胞膜の乱れの修復に時間を要するようになり、細胞への遺伝子などの高分子の導入確率が高くなる。

(実施例)

第1図は本発明の第1の実施例を要する。

上部にはチャンバを兼ねる加熱部2が設けられ、下部にはチャンバを兼ねる冷却部4が設けられ、加熱部2と冷却部4はその間が薄い連結部6で連結されて一体化されている。加熱部2と冷却部4はそれぞれ樹脂又は発泡材のような断熱材で構成されている。

加熱部2には加熱素子8が埋め込まれ、温度制御装置10により加熱部2の温度が所定の温度、例えば37℃になるように制御される。加熱素子8としては例えばペルチェ素子が用いられる。

加熱部2内にはピストン12が設けられ、このピストン12は駆動装置14により上下方向に移動できるようにになっている。ピストン12と駆動

装置14は移動手段を構成している。

加熱部2内に收容された細胞懸濁液16はピストン12によって下方向に押されることにより、連結部6を通過して冷却部4へ送り出されていく。

冷却部4には冷却素子18が埋め込まれており、温度制御装置20により冷却部4の温度が一定温度、例えば10℃以下の適当な温度、になるように制御される。冷却素子18としてはペルチェ素子を用いることができる。

連結部6には一対の電極22、24が設けられ、この一対の電極22、24の間には直流電源装置26により所定の電圧が印加されるようになっている。連結部6における電極22、24の間隔は例えば1mm程度である。

細胞懸濁液16には遺伝子などの高分子と細胞が懸濁されている。

本実施例では加熱部2に細胞懸濁液16を入れ、加熱部2を温度制御装置10により一定温度、例えば37℃に保ち、冷却部4を温度制御装置20により一定温度、例えば10℃に保っておく。

駆動装置14によりピストン12を一定速度で下降させることにより、細胞懸濁液16は連結部6を通過して一定速度で冷却部4へ送り出される。この時、直流電源装置26により電極22、24の間に所定の直流電圧を印加しておく。これにより連結部6を細胞懸濁液16が通過するときに細胞に電気刺激が加えられる。細胞に加えられる電気刺激の強さは連結部6で印加される直流電源の電圧によって決まり、また、その加えられる時間すなわち印加時間は連結部6を通過する細胞懸濁液16の通過速度と電極22、24の長さによって決まる。

連結部6で電気刺激を加えられ冷却部4に送り込まれた細胞懸濁液16は、冷却部4内で冷却される。

細胞懸濁液16が連結部6を通過する速度は駆動装置14により自由に変えることができる。

移動手段は第1図の実施例ではピストン12を備えた形式のものであるが、例えばチッ素ガスのような不活性ガスによる加圧システムでもよい。

要するに一定速度で細胞懸濁液16を加熱部2から冷却部4へ送り出すことのできる装置であればよい。

本実施例は細胞懸濁液16自体を加熱部2から冷却部4へ移動させるフロー方式であるので、連結部6での電極22, 24の間隔を狭くすることができ、小さな直流電源で細胞に大きな電界の強さを与えることができる。電極22, 24の間隔は、細胞の直径と同程度にまで狭くすることができる。

第2図は第2の実施例を表わす。

30は樹脂あるいは発泡材のような断熱材で構成されたケースであり、中央で開閉可能な隔壁32で仕切られ、一方が加熱部30aとなり他方が冷却部30bとなっている。加熱部30aには加熱素子34が設けられ、冷却部30bには冷却素子36が設けられ、加熱素子34と冷却素子36は温度制御装置38により制御される。加熱素子34、冷却素子36として例えばペルチェ素子を用いることができる。加熱部30aは例えば37

度に保たれ、冷却部30bは例えば10度に保たれるように温度制御が行なわれる。

容器30内には加熱部30aと冷却部30bの間で移動するチャンバ40が設けられている。チャンバ40は容器30の底面に設けられた溝42を経て容器30の下方の移動手段としてのチャンバ移動装置44により加熱部30aと冷却部30bの間で移動させられる。チャンバ40がチャンバ移動装置44により移動させられるとき、隔壁32はチャンバ移動装置44によって自動的に開き、チャンバ40の移動が完了したとき隔壁32が自動的に閉じるようになっている。

チャンバ40には一対の平行電極46, 48が設けられている。一対の電極46, 48には高圧パルス発生装置50により一定の直流電圧と一定のパルス幅(印加時間)が印加される。チャンバ40の一対の電極46, 48の間には細胞懸濁液16が収容される。細胞懸濁液16には細胞とその細胞に導入しようとする遺伝子などの高分子が懸濁している。

本実施例では、チャンバ40を加熱部30a内に置き、チャンバ40内に細胞懸濁液16を収容しておく。加熱部30aを一定温度例えば37度に保ち、冷却部30bを一定温度例えば10度に保っておく。

細胞懸濁液16を一定温度に加熱した状態で、高圧パルス発生装置50から細胞懸濁液16に電気刺激を与えた後、チャンバ移動装置44によってチャンバ40を冷却部30bに移動させる。これにより電気刺激を受けた細胞は一定の温度に冷却され、細胞膜の乱れの修復が速くなる。

本実施例では移動手段としてチャンバ移動装置44を用い、チャンバ40を加熱部30aから冷却部30bへ移動するようにしているが、このようなチャンバ移動装置44はチャンバ40の移動と隔壁30の開閉を速に行なうことができるものであればどのような機構のものでもよい。

(発明の効果)

本発明の高分子導入装置では、細胞懸濁液の温度を上げて細胞に電気刺激を与えた後、その細胞

懸濁液を冷却するように構成している。したがって、電気刺激を与える際、細胞懸濁液の温度が上っていることによって細胞膜の流動性が増し、比較的容易に細胞膜の乱れを作ることができるので、弱い細胞刺激によっても細胞の乱れを発生させることができ細胞への損傷が少なくなる。

また、電気刺激によって細胞膜に乱れを作った後に温度を下げるので、細胞膜の乱れの修復に時間を要するようになり、細胞への遺伝子などの高分子の導入確率が上がる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の第1の実施例を示す概略断面図、第2図は本発明の第2の実施例を示す概略断面図である。

2, 30a …… 加熱部、

4, 30b …… 冷却部、

8, 34 …… 加熱素子、

12 …… ピストン、

16 …… 細胞懸濁液、

18, 36 …… 冷却素子。

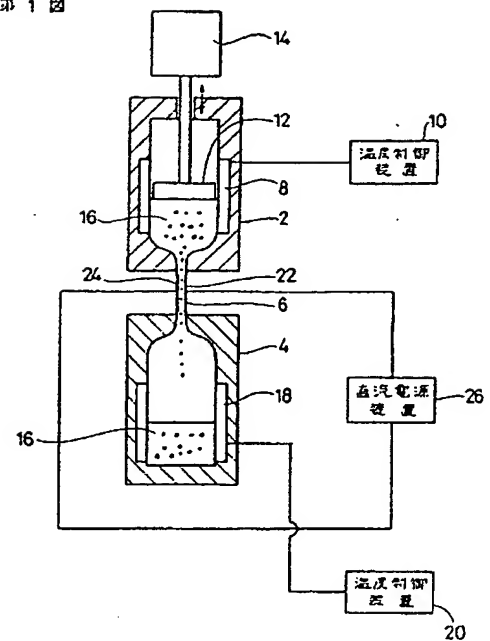
22, 24, 46, 48 …… 電極、

40 …… チャンバ、

44 …… チャンバ移動装置、

代理人 弁理士 野口 繁雄

第 1 図



第 2 図

